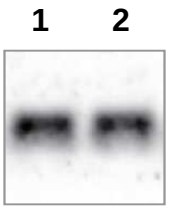
HITACHI
Inspire the Next

末端標識オリゴヌクレオチドプローブ評価例

Labelling ONE DNA-アルカリホスファターゼ標識システムを用いて、オリゴヌクレオチドの3'末端にアルカリホスファターゼを標識したプローブを作成しました。このプローブを用いて酵母RNAに対するノーザンブロットを行いました。

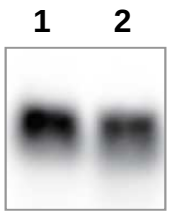
出芽酵母の変異株において、細胞内のmRNA量の変化を調べるコントロール実験を行いました。PCR法により標識したDNAプローブとオリゴヌクレオチドに末端標識したプローブを使用して検討しました。

PCRによる標識DNAプローブ



プローブ: SCR全長(525nt)
60ng/Hybridization buffer 6mL

末端標識オリゴヌクレオチドプローブ



プローブ: SCR オリゴヌクレオチド(70nt)
70 ng/Hybridization buffer 7mL

○実験条件
サンプル:出芽酵母 total RNA 3 μg/レーン (1.2.はそれぞれ変異株)
ハイブリダイゼーション:50℃,オーバーナイト
メンブレン:Hybond N+
検出:発光検出(CDP-Star, 70分露光)
※オリゴヌクレオチドへの標識方法は次ページを参照ください。

「オリゴヌクレオチドプローブ、PCRプローブともに、発現量の多い遺伝子に関して従来の抗原抗体法と同等の結果を得ることができた。」

データご提供:東北大学大学院薬学研究科生命薬学専攻　稲田 利文 教授

ALOKA
illuminate the change

プロトコール

■ 末端標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

1. グルタミン標識

Terminal deoxynucleotidyl transferase（TdT)により、オリゴヌクレオチド(70mer)の3‘末端に複数個のQ-dUTPを修飾しました。(オリゴヌクレオチド：Q-dUTP＝1：10)
※PCRプローブの標識については、製品の取扱説明書に従って行いました。

DNA 合成用試薬グルタミン-dUTP、dNTPセット/ALR-101

オリゴヌクレオチド(100pmol/μL)	1 μL
5x Reaction buffer	4 μL
25mM $CoCl_2$	4 μL
1mM Q-dUTP	2 μL
TdT(400U/μL)	1 μL
Water	8 μL
Total	20 μL

↓37℃ 15分インキュベート
↓0.2M EDTA 2μLを加え、反応停止
↓精製
↓電気泳動によるチェック
↓アルカリホスファターゼ標識へ

2. アルカリホスファターゼ標識

アルカリホスファターゼ標識キット/ALR-103

熱変性済み グルタミン標識プローブ	20 μL(1 μg)
10× Buffer	10 μL
Water	60 μL
Alkaline phosphatase (8 mg/mL)	5 μL
TGase (10 U/mL)	5 μL
Total	100 μL

↓40 ℃ 3 時間 インキュベート
↓ハイブリダイゼーションへ

■ハイブリダイゼーション

①Prehybridization	50℃	30分
②Hybridization	50℃	オーバーナイト
(プローブ濃度: 10 ng/mL)		
③Wash1	50℃	30分 × 2回
④Wash2	室温	10分 × 2回
⑤発光検出 (CDP-Star)	室温	70分

■試薬組成

・Hybridization buffer:
2 M Urea, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 0.5 M NaCl, 1 mg/mL torula yeast RNA,
1×Denhardt‘s solution, 3% Casein, 4% Dextran sulfate (MW 500,000), 0.1% Triton X-100
・Wash1 buffer:
2 M Urea, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100
・Wash2 buffer:
100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM $MgCl_2$, 0.1% CHAPS

・Labellng ONEは日立アロカメディカル株式会社の登録商標です。
・Triton は Dow Chemical Company 社の登録商標です。
・Hybond はGE Healthcare UK Ltd社の登録商標です。
・CDP-StarはTropix, Inc. 社の登録商標です。

日立アロカメディカル株式会社
〒181-8622 東京都三鷹市牟礼6-22-1
計測システム営業部 (0422)-45-5129